

Aus der Hautklinik/Andrologie
im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. W. THIES

Experimentelle Überprüfung der
Verwendbarkeit von Kryosperma-
konserven zum gekreuzten Invasions-
test nach KURZROCK-MILLER

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hartmut Dorn
Bad-Hersfeld

1977

Aus der Hautklinik/Andrologie
im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. W. THIES

Experimentelle Überprüfung der Verwendbarkeit von Kryosperma- konserven zum gekreuzten Invasions- test nach KURZROCK-MILLER

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hartmut Dorn
Bad-Hersfeld

Referent: Prof. Dr. med. R. KADEN

Korreferent: Prof. Dr. med. G. Stüttgen



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 3.8.1977

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
 - 1.1 Andrologische Problematik
 - 1.2 Resultate und Möglichkeiten der Kryospermaforschung
 - 1.3 Zielsetzung der Arbeit
2. Material und Methoden
 - 2.1 Auswahlkriterien und Instruktionen für die Versuchspersonen
 - 2.1.1 Männliche Versuchspersonen
 - 2.1.2 Weibliche Versuchspersonen
 - 2.2 Spermogramm
 - 2.3 Vorbereitung und Methodik der Humanspermakonservierung
 - 2.4 Cervix-Mucus Untersuchungen
 - 2.5 Invasionstest nach KURZROK-MILLER
3. Ergebnisse
 - 3.1 Vergleich der Motilitätsraten von Frisch- und Kryosperma
 - 3.2 Vergleich von Frisch- und Kryosperma im Invasionstest nach KURZROK-MILLER
 - 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse
4. Diskussion
5. Zusammenfassung
6. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Andrologische Problematik

Man schätzt, daß in der Welt 10 - 20 % aller Ehen kinderlos sind (74) (92) (108). Allein in der BRD sind in der Literatur 12 % ungewollt kinderlose Ehepaare angegeben. Das entspricht 1,3 Millionen infertilen Ehepaaren in der BRD (93) (132).

Dringend erscheint eine Verbesserung der diagnostischen Maßnahmen, wenn man sich klar macht, daß die Konzeptionswahrscheinlichkeit bei bestehendem Kinderwunsch mit den zunehmenden Jahren einer Ehe fällt. So gibt Stoll (132) nach zwei ungewollt kinderlosen Ehejahren eine Konzeptionswahrscheinlichkeit von 12 % an; nach 7 Jahren nur noch eine verschwindend geringe. Einigkeit besteht darin, bei bestehendem Kinderwunsch von einem Jahr und nicht erfolgter Konzeption, beide Ehepartner einer ärztlichen Untersuchung zu unterziehen. Die diagnostischen Bemühungen müssen ein großes Spektrum an Störfaktoren untersuchen.

STOLL (132) und auch SCHIRREN (108) geben etwa übereinstimmend die Ursachen für Sterilität und Infertilität durch die Frau bedingt mit 50 % an, durch den Mann mit 30 - 40 % und durch beide Ehepartner mit 10 - 20 % an. Als ursächlich bedeutend teilt STOLL (132) bei der Ehefrau ein: Ovarialfaktor 45 %, Tubenfaktor 25 %, Korpusfaktor 10 %, Zervixfaktor 10 %, Vaginalfaktor 10 %.

Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit immunologisch bedingten Ursachen einer Sterilität (30) (39) (43) (47) (48) (74) (75) (83) (96) (135). LEHMANN (75) untersuchte 1000 Patientinnen seiner Sterilitätssprechstunde mit dem Agglutinationstest nach FRANKLIN, kontrolliert mit dem Immobilisationstest nach ISOJIMA und fand bei 2 - 3 % dieser Patientinnen einen Hinweis auf immunologisch bedingte Sterilität. Die Basisdiagnostik bei bestehender Sterilität muß die andrologische Untersuchung

des Mannes miteinbeziehen (25) (56) (57) (58) (60) (64). Bedeutend ist die Untersuchung des Ejakulates. Im Rahmen einer Routineuntersuchung sollten die Karenzzeit erfragt und folgende Werte bestimmt werden: Volumen, Verflüssigungszeit, ph, Anzahl der Spermien, prozentualer Anteil der beweglichen Spermien, Qualität der Motilität, Differentialspermiocytoqramm, Initialfruktose, Fruktoseverbrauch nach 5 und 24 Stunden (62). Bei bestehender Subfertilität bzw. Infertilität können spezielle Untersuchungen wie Hodenbiopsie, Hormonanalysen, Kerngeschlechtsbestimmungen und Chromosomenanalysen erforderlich sein. Einen guten Überblick über möglicherweise erforderliche Untersuchungen gibt das von KADEN entwickelte Schema eines einfachen und erweiterten Spermioqramms (61). Auf die Bedeutung von Spermatozoeninfektionen weisen KADEN und GROSSGEBAUER (40) (63), FRIBERG (34) und HORNE (144) in ihren Arbeiten hin. Die Relevanz immunologischer Untersuchungen des Ejakulates zeigen BOTELLA-LLUSIA (12), GROGAARD (18), FJÄLLBRANDT (29) (30) (129), GRADL (39), HERRMANN (42), HUSTED (46), LESLIE (77), METTLER (91) (92) (93), RUMKE (99), SULLIVAN (134), TAIT (135) und WILSON (147).

Als andrologische Basisuntersuchung müssen zunächst Spermio- und Spermioctogramm angesehen werden, obwohl deren Normwerte noch keineswegs ein Kriterium schlechthin für die Zeugungsfähigkeit des Mannes sind. So fordern mehrere Autoren wie JOEL 51) (53), LÜBKE (80), ULSTEIN (138) (141) (142) (143), KREMER (68) (69), routinemäßig die Fähigkeit des Zervikalsekrets zur Aufnahme von Samenfäden und die Penetrationsfähigkeit der Spermien in den Zervikalschleim zu untersuchen. Zervikalsekret-Untersuchungen geben auch bei positiven Ergebnissen unabhängig von der Penetrations-Test-Methode kein sicheres Kriterium für eine tatsächliche Konzeptionsfähigkeit (2) (36) (138) (141) (127), jedoch zei-

gen besonders die Arbeiten von KREMER (68) und ULSTEIN (142) deren statistische Bedeutung. ULSTEIN (141) (142) (143) konnte ersten eine statistisch signifikante Beziehung zwischen Konzeption und Penetrationsfähigkeit herstellen, zweitens feststellen, daß die Korrelation im Zervikalschleim höher ist als die Korrelation zwischen Fertilität und den Routineuntersuchungen des Ejakulates (143).

1868 beschrieb SIMS (122) als erster den Postcoital-Penetrations-Test, 1913 führte HUHNER (45) diesen Test als Routineuntersuchung ein. KURZROCK und MILLER veröffentlichten 1928 und 1932 (71) (72) (94) ihre Arbeiten zur Verwendung des einfachen und gekreuzten Invasionstestes. LAMAR (73), SCHWARTZ (110) (111), RUIZ-VALASCO (98) und BOTELLA-LLUSSIA (12) (13) beschreiben ebenfalls Methoden, um die Penetrationsfähigkeit der Spermien zu testen. 1968 veröffentlichte KREMER (68) im Rahmen seiner Dissertationsschrift die Beschreibung eines Penetrationstestes, welcher nicht nur die Penetrationsfähigkeit, sondern auch die Penetrationsstrecke objektiviert. Er nannte den Test: SPM-test = the in vitro spermatozoal penetration test using the SPM "sperm penetration meter (55). In der Literatur wird dieser Test häufig als die capillary-tube Methode bezeichnet. 1976 beschreiben in einer vorläufigen Darstellung KREMER und JAGER (69) den sperm-cervical-mucus contact test. In der klinischen Praxis finden wegen ihrer unkomplizierten Anwendungsweise der Postcoital-Penetrations-Test, der Invasionstest von KURZROCK-MILLER und der von KREMER beschriebene in vitro spermatozoal penetration test die größte Beachtung.

1.2. Resultate und Möglichkeiten der kryospermaforschung

Zweck der Vervollständigung aller diagnostischen Bemühungen war es stets, infertilen Ehepartnern den seit geraumer Zeit bestehenden Kinderwunsch zu erfüllen.

Die Fortschritte kryobiologischer Konservierung von Humansperma eröffnen prophylaktische, therapeutische und diagnostische Möglichkeiten. Unter dem prophylaktischen Aspekt können Spermaproben bei drohender Infertilität eingefroren werden. Für die therapeutische Insemination können Kryospermakonserven verwandt werden. Diagnostische Möglichkeiten bestehen darin, daß Kryospermakonserven für gekreuzte Invasionsteste eingesetzt werden können. Erstmals beschrieb SPALLANZANI 1776 (128) seine Beobachtung, daß einige wenige Spermatozoen im Schnee nach folgender Erwärmung überleben, SHETTLES 1940 (118) erreichte eine Überlebensrate von 10 % der tiefgekühlten Spermien bei Einfrierungstemperaturen von -196°C . Die schützende Funktion des Glycerols für die Kryospermakonservierung entdeckten 1949 POLGE, SMITH und PARKES (97). SHERMAN erreichte 1954 (112) Überlebensraten nach dem Auftauen von 67 % und berichtete später über erste Inseminationen mit tiefgefrorenem Sperma. Eine große Anzahl von Autoren (3) (4) (8) (32) (38) (63) (80) (100) (112) (113) (114) (115) (141) (148) berichtet über eine Vervollständigung der Kryotechnik, so daß heute nur noch Motilitätsverluste von 10 - 30 % hingenommen werden müssen. Die therapeutische Anwendung von Frisch- oder Kryosperma zur homologen und heterologen Insemination wird von den folgenden Autoren besprochen und diskutiert: (6) (7) (23) (24) (26) (27) (37) (55) (81) (89) (101) (102) (103) (106) (119) (119) (129) (131) (140).

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der erweiterten Fertilitätsdiagnostik entstehen häufig Schwierigkeiten bei der vorschriftsmäßigen Durchführung von Invasionstesten. So muß die Ehefrau einen Tag vor dem Ovulationstermin einbestellt werden und Zervixsekret entnommen werden. Zur gleichen Zeit wird auch das Ejakulat des Ehemannes benötigt, oft auch weitere Samenspenden, um einen gekreuzten Invasionstest

durchführen zu können. Oftmals hat die Frau einen anovulatorischen Zyklus, oder das Zervikalsekret zeigt noch keine präovulatorischen Zeichen. Die Frau muß erneut zur Untersuchung einbestellt werden. Es ist offensichtlich, daß sowohl Termenschwierigkeiten seitens des Ehepaares, als auch der fremden Samenspender, nicht zuletzt auch der klinische Aufwand eine befriedigende diagnostische Abklärung erschweren. Wegweisend für die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war die Möglichkeit, Kryospermakonserven in der von R. KADEN im Klinikum Steglitz aufgebauten Kryospermabank zu sammeln. Ziel der Arbeit soll sein, experimentell zu überprüfen, inwieweit Kryospermakonserven im Vergleich zu Frisch-Sperma zum gekreuzten Invasionstest nach KURZROK-MILLER verwendbar sind. Die Hypothese der Arbeit ist, daß die Penetrationsfähigkeit von Kryosperma durch den Einfrier- und Auftauprozess nicht beeinflusst wird.

Falls die Hypothese sich bestätigen läßt, könnten sowohl Kryospermakonserven des Ehemannes, als auch von fremden Samenspendern zum tatsächlichen, dem Menstruationszyklus entsprechenden Termin abgerufen werden. Eine hieraus folgende Vereinfachung des Testvorhabens könnte sicherlich die Durchführung von Invasionstests bei der Untersuchung von infertilen Ehen erleichtern.

2. Material und Methoden

Eigene Untersuchungen

Ejakulatproben von 72 freiwilligen Versuchspersonen wurden im gekreuzten Invasionstest nach KURZROK-MILLER mit dem Cervixmucus von 2 weiblichen Probanden getestet. Grundsätzlich wurden alle 72 Ejakulate sowohl als Frischsperma und als Kryosperma im Vergleich mit dem gleichen Zervixschleim getestet.

2.1. Auswahlkriterien und Instruktionen für die Versuchspersonen

2.1.1. Männliche Versuchspersonen

Es wurden freiwillige, männliche, gesunde Versuchspersonen gesucht, die Ejakulate für die Untersuchung zur Verfügung stellten. Die Probanden wurden gebeten, jeweils eine 4 - 5-tägige Karenzzeit einzuhalten, um ein qualitativ gutes Ejakulat zu erhalten. Es konnten 72 männliche Versuchspersonen in die Studie aufgenommen werden. Das durchschnittliche Alter der Versuchspersonen betrug 25,8 Jahre. Es handelte sich ausschließlich um Studenten, die sich für die Untersuchung zur Verfügung stellten.

Die Ejakulate wurden in der Klinik durch Masturbation gewonnen. Von sämtlichen Ejakulaten wurde sofort nach der Gewinnung ein Spermiogrammbefund erhoben. Anschließend wurden 72 Ejakulatproben für den kryobiologischen Einfriervorgang vorbereitet und eingefroren. Diese Kryospermakonserven wurden zum präovulatorischen Termin der weiblichen Versuchspersonen aufgetaut und das Penetrationsverhalten dieser Kryospermakonserven im gekreuzten Invasionstest nach KURZROK-MILLER untersucht. Weiterhin wurden sämtliche Kryospermaproben hinsichtlich der Rate an beweglichen Spermien nach dem Einfrier- und Auftau-prozeß ausgezählt. Somit konnte die durch die kryobiologische Technik bedingte Verlustrate an beweglichen Spermien bestimmt werden.

Die Kryospermakonserven wurden jeweils zum präovulatorischen Termin aufgetaut. Zwei Frauen wurden in die Studie aufgenommen, somit ergaben sich zwei unterschiedliche präovulatorische Termine. Zu diesen präovulatorischen Terminen wurden sämtliche männliche Versuchspersonen erneut einbestellt, um Ejakulatproben zu spenden. Der erste präovulatorische Termin lag 14 Tage, der zweite 73 Tage nach dem Tag, an dem die Kryospermakonserven angelegt wurden. Hieraus folgend betrug die Lagerungszeit

der tiefgefrorenen Spermakonserven 14 bzw. 73 Tage.

Es mußten zwei Versuchsreihen durchgeführt werden.

Versuchsreihe I: 14 Tage nach dem Anlegen der Kryospermakonserven

Versuchsreihe II: 73 Tage nach dem Anlegen der Kryospermakonserven

Am jeweiligen präovulatorischen Termin konnten somit 72 verschiedene Ejakulatproben sowohl als Frisch- als auch als Kryosperma im gekreuzten Invasionstest nach KURZROK-MILLER hinsichtlich der Penetrationsfähigkeit jeweils zum gleichen Zervixplasma untersucht werden.

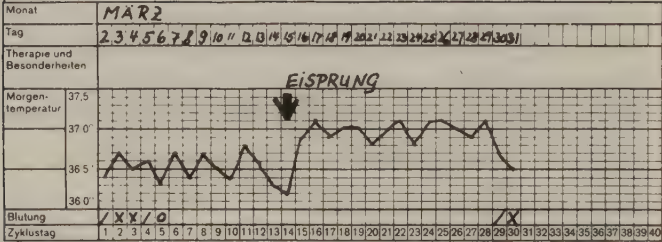
2.1.2. Weibliche Versuchspersonen

Es wurden weibliche Versuchspersonen gesucht, die bereits mindestens einmal schwanger waren und zur Zeit keine hormonellen Kontrazeptiva einnahmen. Zwei Frauen wurden in die Studie aufgenommen. Frau A., 22-jährig und Frau B., 27-jährig, beide Studentinnen, erklärten sich bereit, über 3 Monate hinweg einen Zykluskalender zu führen, so daß im 3. Monat der präovulatorische Termin annähernd voraussagbar war und die männlichen Versuchspersonen einbestellt werden konnten.

Die Frauen wurden gebeten, vor dem Aufstehen rectal oder sublingual die Basaltemperatur möglichst immer zur gleichen Zeit, 3 Minuten lang zu messen. Weiterhin sollten sie Blutungen und Besonderheiten wie: Messen nach dem Aufstehen, vorabendlicher Alkoholgenuß und fieberhafte Erkrankungen, eintragen. Für die Blutungsstärke wurden folgende Symbole vereinbart: starke Blutung x, mittlere /, schwache o, und Schmierblutung `.

Beide Frauen zeigten einen regelmäßigen, biphasischen Zyklus mit 28- bzw. 27-tägigem Zyklus. Mittels der Basaltemperaturkurve wurde der präovulatorische Termin bei Frau A. am 14. Tag, bei Frau B. am 13. Tag angenommen. An diesen präovulatorischen Terminen wurden die

FRAU A



FRAU B

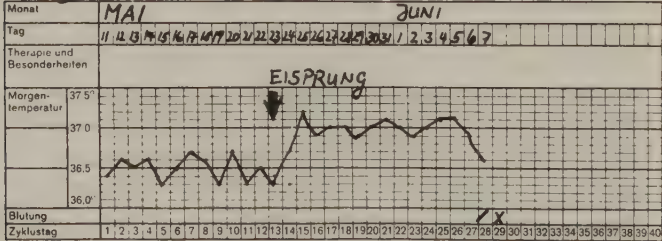


Abbildung 1: Bestimmung des präovulatorischen Termins durch regelmäßige Messung der Basaltemperatur. Bei Frau A. wurde der Eisprung am 14. Tag angenommen, bei Frau B. am 13. Tag.

Frauen einbestellt und Zervixplasma entnommen. Zur Bestätigung des präovulatorischen Termins wurden jeweils ein Objektträger mit Cervixplasma bestrichen und getrocknet, um das Arborisationsphänomen zu beobachten. Unter Östrogeneinwirkung entsteht eine sehr charakteristische Bildung von farnkrautähnlichen Kristallen im getrockneten Zervixschleim (104). Weiterhin wurde der pH des Zervixschleims gemessen. Makroskopisch wurde darauf geachtet, ob der Zervixschleim durchsichtig, dünnflüssig war und sich als langer Faden von einem Objektträger ausziehen ließ. Die Spinnbarkeit beträgt bis zu 12 cm. Mikroskopisch wurde auf den Leukocytengehalt des Zervixschleims geachtet. Das Mucusvolumen wurde nicht bestimmt.

2.2. Spermiogramm

Das durch Masturbation gewonnene Ejakulat wurde in sterilen Weithalsflaschen sofort nach Gewinnung in das andrologische Labor gebracht. Hier wurde anschließend das übliche andrologische Untersuchungsprogramm eingeleitet und die Daten wurden auf den Formularen, wie anliegend, eingetragen. Die Karenzzeit wurde erfragt, die Verflüssigungszeit in Minuten festgehalten, der pH gemessen und die qualitative Motilität nach den Kriterien (1) lebhaft, (2) mäßig und (3) schwach, mikroskopisch bestimmt.

Zur quantitativen Bestimmung der Motilität wird 1 Tropfen des Sperma mit NaCl versetzt, so daß maximal 20 Spermien pro Gesichtsfeld zu zählen sind. Es werden 5 - 10 Blickfelder betrachtet und 100 Spermien nach dem Kriterium 'beweglich' oder 'unbeweglich' ausgezählt. Die Angabe der quantitativen Motilität erfolgt in x% beweglich: Rest unbeweglich.

Zur Bestimmung der Anzahl der Spermien wird eine Verdünnung von 1 : 20 mit einer Leukopipette hergestellt und in der Zählkammer nach NEUBAUER die Dichte gezählt. Die Kammer besteht aus 9 Großquadraten; ein Großquadrat enthält 16 Gruppenquadrate und hierin sind je 16 Kleinstquadrate enthalten. Es müssen 5 Gruppenquadrate ausge-

KLINIKUM STEGLITZ
der FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN
HAUTKLINIK und POLIKLINIK
ANDROLOGIE

Name:
Geburtsdatum:
Adresse:

frisch-Sperma

Kryo-Sperma

Spermogramm

ja nein

Einfrierdatum:

Auftaudatum:

Markierung-Code-Nr.:

Datum

Tag Monat Jahr
15 16 17 18 19 20

Zeit

Ort

Ejakulat

Verflüssig. Zeit

min

Letzter Samenerguß vor

Tagen

pH

,

Volumen

, ml

Besond. Beschaffenheit

Nativpräparat

Spermien

Anzahl

, Mill/ml

Mill/To

Bewegliche Spermien

%

nach 5 Stunden

%

Qual. Motilität

lebhaft (1) mäßig (2) schwach (3)

Initial

nach 5 Stunden

Unverhältnismäßig verzögerte Fortbewegung Ja (1) Nein (2)

Differential-Spermacytogramm

bei

ausgezählten Zellen in %

Normale

Spermatogonien

Abnorme

Spermatocyten

Jugendliche

Spermatiden

Senile

Restkörper

Degenerationsformen

Sonstiges Ja (1) Nein (2)

Spermialiquor

Initialfruktose

g/ml

Fructoseverbrauch nach 5 Stunden

g/ml

nach 24 Stunden

g/ml

Beurteilung

P
A
T.
-
A
K
T
E

Abbildung 2: Spermogrammformulare der Andrologischen Klinik

zählt werden.

Gezählte Spermien $\times 10^6$ = Mill. Spermien/ml.

Die Spermiengesamtzahl errechnet sich aus der Dichte -
Mill. Spermien/ml $\times$ Volumen des Ejakulates.

Anschließend wurden die Ejakulatproben zur Kryospermakonservierung vorbereitet.

2.3. Vorbereitung und Methodik der Humanspermakonservierung

Das beiliegende Bildmaterial soll einen Überblick über das notwendige Instrumentarium zur Kryospermakonservierung ermöglichen. Zu den notwendigen vorbereitenden Arbeiten gehört das Ansetzen einer Schutzkolloidlösung, die, ebenso wie das Einfrierschema, protektiv die Zellmembran der Spermien schützen und während des Einfrierens eine intrazelluläre Kristallisation verhindern soll (63) (87). Die kolloidale Schutzlösung besteht aus:

Eigelb (frisch) 20,0 ml,
Glycerin $C_3H_8O_3$ doppelt destilliert (87 %), 14,0 ml
D (+) - Glucose 26,0 ml
Natr.Citrat ($Na_3C_6H_5O_7 + 2 H_2O$), 2,9 %, Ansatz
aufgefüllt auf 100,0 ml.

Diese Ei-schutzkolloide-Stammlösung wird mit folgenden Zusätzen zum gebrauchsfertigen Gemisch:

Schutzkolloide Stammlösung 1,0 ml
Streptomycin 0,5 mg
Glykokoll 20,0 mg.

Diese Lösung wird 30 Minuten im Wasserbad von $56^{\circ}C$ erwärmt. Anschließend mit 1 NaOH der ph auf 7,2 - 7,4 eingestellt.

In einer Impfkapselle, die einen Schutz vor Luftkeimen darstellt, werden mit einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 2, ein Teil Sperma und ein Teil Schutzlösung in kleine Plastikbehälter gefüllt. Dieses Gemisch wird in einem

Rotator 5 - 10 Minuten geschwenkt; eine gleichmäßige nicht so schnelle Drehung muß gewährleistet sein, um eine Schaumbildung zu verhindern. Anschließend wurde das Sperma-Schutzkolloid-Gemisch in Pailletten gefüllt. Pro Proband wurden mindestens 5 Pailletten mit 0,2 ml Inhalt gefüllt und mit einem Kunststoffpuder verschlossen. Die Pailletten wurden sorgfältig mit Codenummern markiert. Für den kryotechnischen Einfriervorgang wurde die Methodik der Berliner Gruppe angewandt, wie sie von KADEN und SOKOL entwickelt und beschrieben wurde (63) (123) (124) (125) (126) (148). Die halbautomatische biologische Einfriervorrichtung ist in der Bilderserie zu sehen, sie ist durch ein Thermoelement mit einem Kompensographen verbunden, der die Temperaturveränderungen während des Einfriervorganges kontinuierlich graphisch darstellt. Stufenweise wurde ein Behälter mit gefüllten Pailletten näher an den flüssigen Stickstoff geführt. Je geringer der Abstand zum Flüssigstickstoff ist, desto intensiver ist die Kälteeinwirkung.

Es wurde in 3 Etappen eingefroren und das von KADEN, SOKOL und WÖLKE benutzte Einfrier-Schema verwandt (63) (123) (148).

Tabelle 1: Einfrier-Zeit-Schema

Temperatur	Einfriergeschwindigkeit	Einfrierzeit
1.) von 20°C bis -18°C	9,5°C/min.	4 min.
2.) von -18°C bis -96°C	17,5°C/min.	4 min. 25 sec.
3.) von -96°C bis -196°C	111,0°C/min.	0 min. 54 sec.
Gesamteinfrierdauer:		9 min. 19 sec.



Abbildung 3: Impfkapelle mit Instrumentarium zur Vorbereitung der Kryospermakonservierung

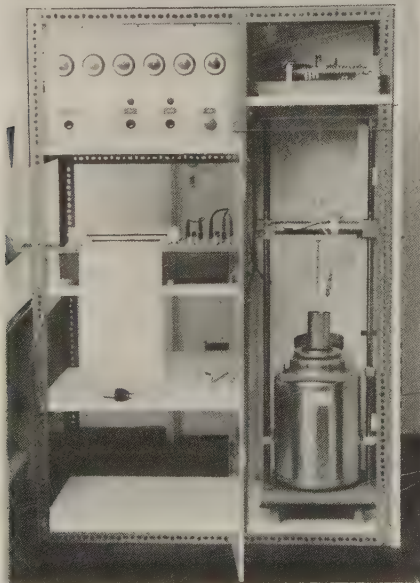


Abbildung 4: Halbautomatische biologische Einfriervorrichtung mit Kompensographen

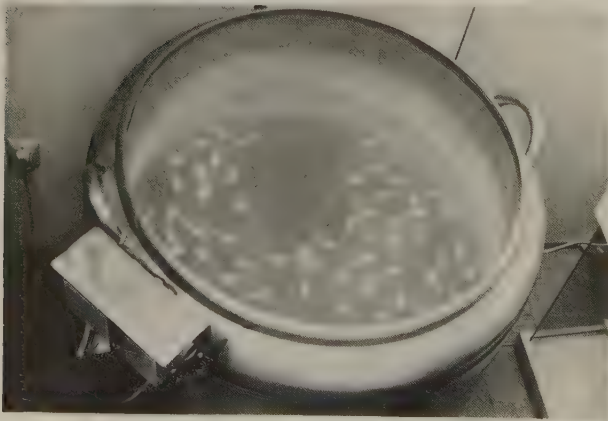
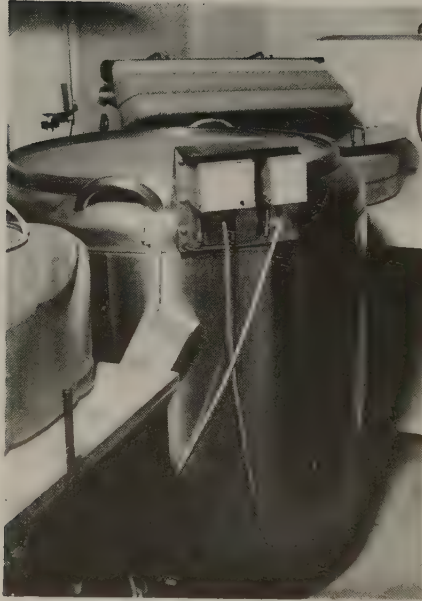


Abbildung 5: Kryospermabank zur Lagerung von kryobiologisch konservierten Spermaproben

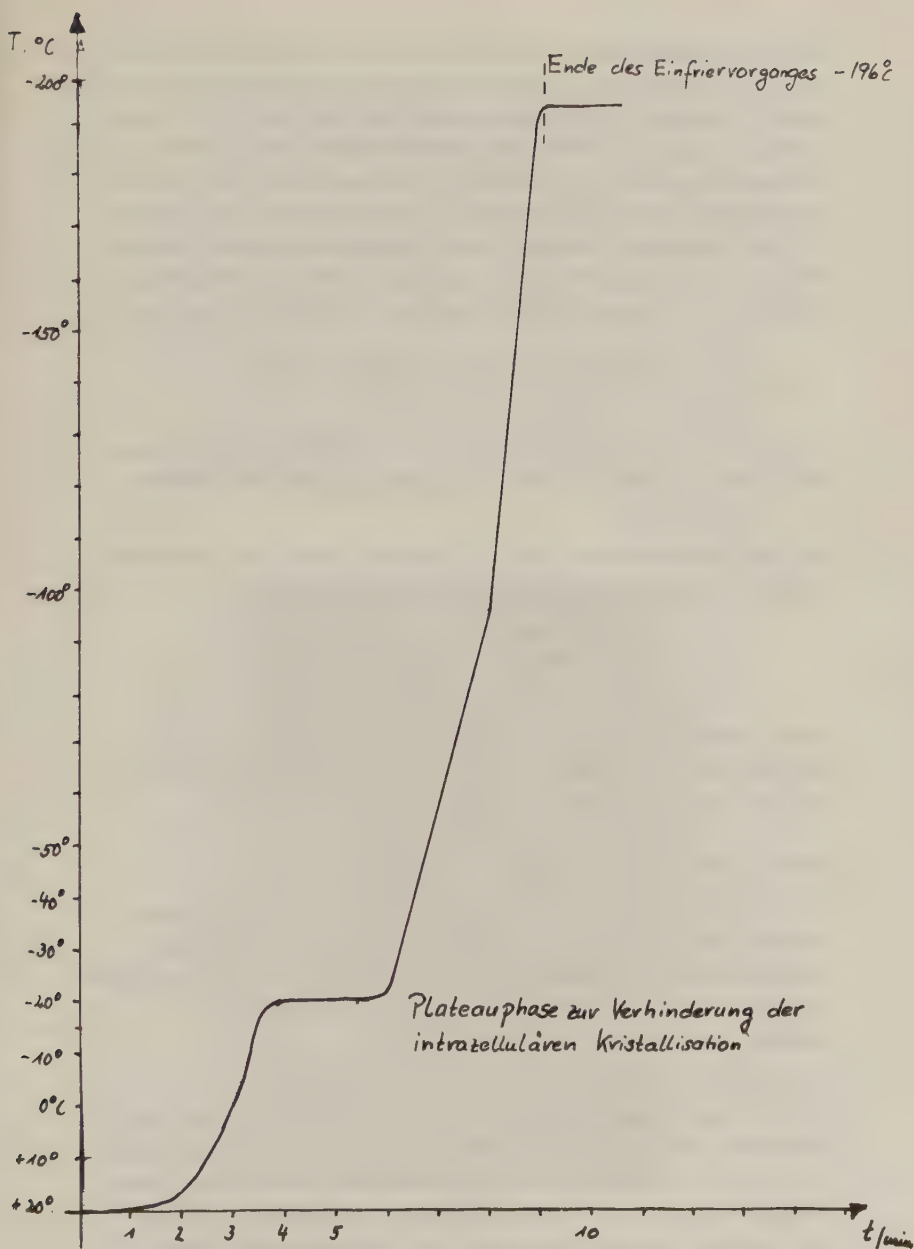


Abbildung 6: Veränderung der Temperatur während des Einfriervorganges, aufgezeichnet mit einem Kompensographen.

Nach dem Einfrieren wurden die Ejakulatproben in der Kryospermabank bei einer konstanten Temperatur von -196°C gelagert. Die Lagerungszeiten differierten zwischen 14 und 73 Tagen. Am präovulatorischen Termin beider Frauen wurden jeweils 72 Kryospermabproben in einem Wasserbad von $+36^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und die Anzahl der beweglichen Spermien nach der Tiefkühlbehandlung bestimmt. Somit konnte die Überlebensrate, bezogen auf die Initialbeweglichkeit maschinell errechnet werden.

$$\frac{Y}{X} \times 100 \% = \text{Überlebensrate in \%}$$

Die Motilität nach dem Auftauen = Y, bezogen auf die Motilität vor dem Auftauen = X, ergibt die Überlebensrate in Prozent.

Der Motilitätsverlust in % , bedingt durch die kryobiologische Behandlung wurde ebenfalls errechnet.

$$\frac{Y - X}{X} \times 100 \% = \text{Motilitätsverlust in \%}$$

Somit konnten die durchschnittlichen Überlebensraten und Motilitätsverluste, die durch den kryobiologischen Einfriervorgang bedingt sind, festgestellt werden.

2.4. Zervix-Mucus Untersuchungen

Bei zwei Frauen (A und B) wurde zum präovulatorischen Termin Zervixschleim entnommen, um alle Samenproben (Frisch- und Kryosperma) gegen den gleichen Zervixschleim im gekreuzten Invasionstest nach KURZROK-MILLER zu testen.

Die Portio wurde mit einem Spekulum eingestellt, das Ostium externum uteri mit einem trockenen Tupfer gereinigt. Mit einer 10 ml Spritze wurde das Cervixplasma in eine 40 cm lange sterile Nabelsonde, die einen Querschnitt von $2,0 \times 3,0$ mm aufweist, langsam aspiriert. Bei beiden Frauen imponierte das Cervixplasma durchsichtig und dünnflüssig. Der ph wurde mit 8,0 bestimmt.

Mikroskopisch betrachtet fanden sich in beiden Präparaten wenige Leukocyten. Die Spinnbarkeit betrug bei dem Cervixplasma A 9,5 cm und 8,0 cm des Cervixplasmas B. Das Arborisationsphänomen mit der charakteristischen Bildung von farnkrautähnlichen Kristallen konnte, nach dem jeweils ein Objektträger mit Cervixplasma bestrichen und getrocknet wurde, bei beiden Proben eindrücklich beobachtet werden. Abbildung 7 und 8 zeigen die Spinnbarkeitsuntersuchung und den Farnkrauttest.

Nach den genannten Untersuchungen zur Sicherung des präovulatorischen Termins wurde das Cervixplasma A und B für die beiden Testreihen tropfenweise auf Objektträger gebracht und der gekreuzte Invasionstest nach KURZROK-MILLER durchgeführt.

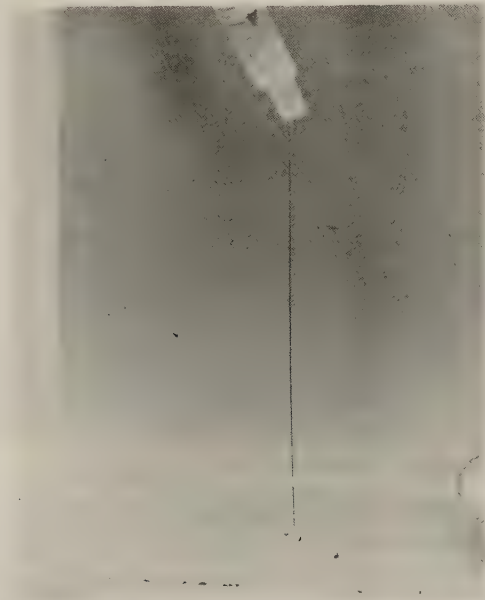


Abbildung 7: Untersuchung des Zervixplasmas auf das präovulatorische Kriterium Spinnbarkeit

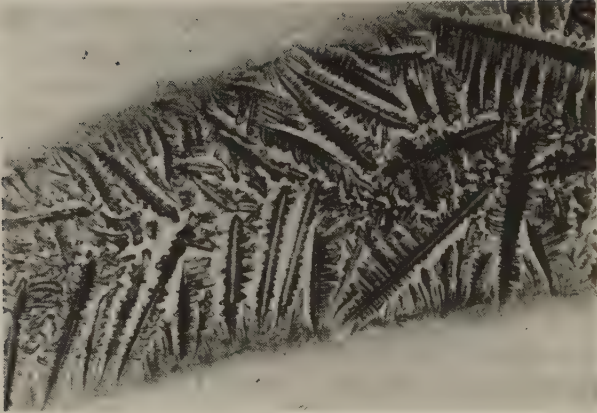


Abbildung 8: Arborisationsphänomen mit charakteristischer
Bildung von farnkrautähnlichen Kristallen.
Abbildung oben Vergrößerung 80-fach,
unten 320-fach

2.5. Gekreuzter Invasionsstest nach KURZROK-MILLER

Der erstmals von E.G. MILLER und R. KURZROK 1932 beschriebene Invasionsstest (94) ermöglicht die mikroskopische Betrachtung, wie Spermien in das Cervicalplasma penetrieren. Dieser Invasionsstest kann mit dem Ejakulat des Ehemannes (= einfacher Invasionsstest) und mit den Ejakulaten fremder Ejakulatspender (= gekreuzter Invasionsstest) durchgeführt werden.

Zur Durchführung des Invasionsstests muß auf einen Objektträger ein kleiner Tropfen von 3 - 4 mm Durchmesser Cervixplasma gebracht werden. Mit einem Abstand von etwa 3 mm muß ein 3 - 4 mm kleiner Tropfen Ejakulat neben den Zervixschleim placiert werden. Anschließend wird ein Deckglas auf beide Tropfen gelegt, wobei das Deckglas zuerst auf den Zervixschleimtropfen und sodann vorsichtig auf den Ejakulattropfen gesenkt wird. Das Deckglas liegt dann auf beiden Tropfen und bedingt ein Ausbreiten beider Tropfen, so daß eine Kontaktzone zwischen Cervixplasma und Ejakulattropfen entsteht. Diese Kontaktzone wird mikroskopisch vorerst 5 Minuten lang mit einer 320-fachen Vergrößerung beobachtet. Nach einer Wartezeit von 30 Minuten und später nach 120 Minuten werden die in der Zwischenzeit in feuchten Kammern gelagerten Objektträger erneut mikroskopisch kontrolliert. Die Unterscheidung zwischen Ejakulat und Cervixplasma fällt leicht, einerseits massenhaft Spermien, andererseits ein klares Medium mit vereinzelt Leukocyten. An der Kontaktzone sammeln sich die Spermien, mit den Köpfen in Richtung Cervixplasma orientiert, in zweier bis vierer dichten Reihen. Nach 2 bis 5 Minuten entstehen am Rand der Kontaktzone trichterförmige, trianguläre Phalangen, die mit der Spitze der dreieckigen Form in das Cervixplasma eindringen, die Basis des Dreieckes liegt dem Ejakulattropfen an. Vereinzelt lösen sich einzelne Reihen aus dieser Formation und verzweigen sich einreihig in das Cervicalplasma zu

einem astartigen Geflecht, bis sich in großer Anzahl einzelne Spermien aus dem Verband lösen und in das Cervicalplasma eindringen. Zuletzt nach 30 und 120 Minuten ist das Cervicalplasma völlig durchdrungen mit Spermien. Ein in dieser Abfolge verlaufender Test ist als positiver Invasionstest zu werten. Der Test ist negativ zu bewerten, wenn nach Ablauf von 30 und 120 Minuten die Spermien ausschließlich am Rande der Kontaktzone gesammelt sind und nur vereinzelte Spermien im Cervixplasma erscheinen. Ein negatives Ergebnis sollte durch den gekreuzten Invasionstest mit einem fremden Ejakulatspender kontrolliert werden. Falsche positive Ergebnisse können durch eine falsche Labortechnik entstehen. Falls das Deckglas auf die Ejakulat- und Cervicalplasmotropfen unvorsichtig aufgelegt wird, kann das Cervicalplasma mit Ejakulat überschwemmt werden. Mikroskopisch imponieren sofort bei Betrachtung des Präparates zahlreiche Spermien im Cervicalplasma, da eine Ejakulatschicht über das Cervicalplasma geschoben wurde. Es haben sich jedoch noch keine typischen Invasionsformen gebildet, deshalb müssen solche Teste wiederholt werden. Bei sorgfältiger Ausführung jedoch ist der KURZROK-MILLER-Invasionstest ein praktikabler und leicht durchzuführender Test.

In der beschriebenen Testanordnung wurden zwei Testreihen mit jeweils 72 verschiedenen Ejakulaten mit Frisch- sowie mit Kryosperma einmal mit dem Cervicalplasma A und anschließend mit dem Cervicalplasma B durchgeführt.

Testreihe 1

Cervicalplasma A .. VP₁ Frisch-Sperma (F)

:

A .. VP₇₂ Frisch-Sperma (F)

Cervicalplasma A .. VP₁ Kryosperma (K)

:

A .. VP₇₂ Kryosperma (K)

Testreihe 2

Cervixplasma B .. VP₁ Frisch-Sperma (F)

⋮
B .. VP₇₂ Frisch-Sperma (F)

Cervixplasma B .. VP₁ Kryosperma (K)

⋮
B .. VP₇₂ Kryosperma (K)

Die Objektträger wurden sorgfältig in der oben aufgeführten Weise markiert, so daß eindeutig Cervicalplasma A und B, die Ejakulatprobe und, ob es sich um Frisch- oder Kryosperma handelte, zu erkennen war.

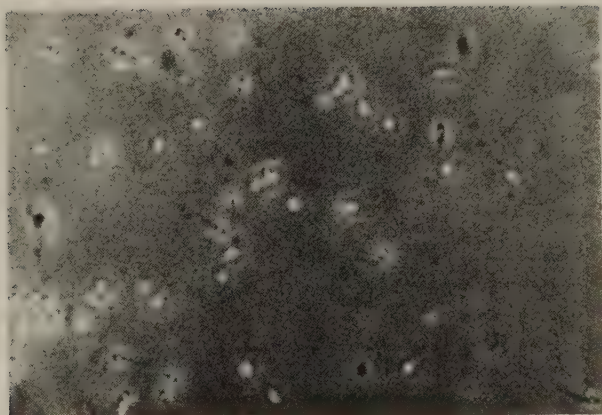


Abbildung 9: Positiver Invasionstest nach KURZROK-MILLER.
Unten links im Bild die trianguläre, trichter-
förmige Phalanxformation, zur Bildmitte hin
in das Cervicalplasma hineinragend.
Fotografiert im Doppelkontrastverfahren 6 Mi-
nuten nach Testbeginn mit einer 320-fachen
Vergrößerung.

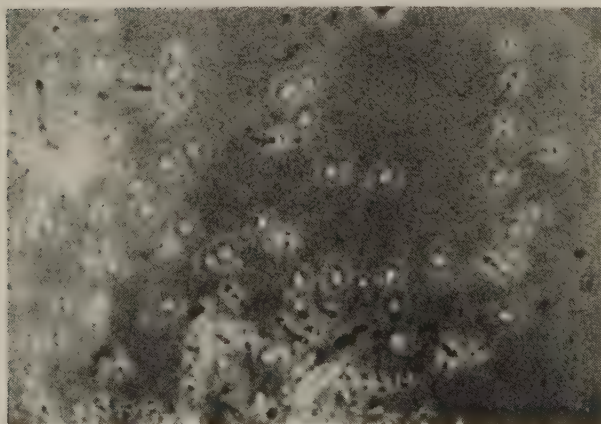


Abbildung 10: Positiver Invasionstest nach KURZROK-MILLER
Gleicher Bildausschnitt wie Abbildung 9,
nach 15 Minuten fotografiert.

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich der Motilitätsraten von Frisch- und Kryosperma

Von besonderem Interesse war, die prozentuale Initialbeweglichkeit des Frisch-Spermas mit der Rate an beweglichen Spermien nach der kryobiologischen Behandlung zu vergleichen, um die durchschnittlichen Überlebensraten und den quantitativen Motilitätsverlust bestimmen zu können.

In der Tabelle 2 sind die einzelnen Spermiogrammwerte von den 72 männlichen Versuchspersonen dokumentiert. In dieser Tabelle sind die beweglichen Spermien in Prozent des Frisch-Spermas aufgeführt. Die prozentualen Raten der beweglichen Spermien des Frischspermas sind in der Tabelle 3 gegenübergestellt zu den Raten der beweglichen Spermien des Kryospermas. Gleichzeitig aufgeführt wurden die Überlebensraten in Prozent, bezogen auf die Initialbeweglichkeit. Die einzelnen Motilitätsverluste in Prozent der kryobiologisch behandelten Ejakulate sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

Graphisch dargestellt ist der durch die Tiefkühlbehandlung bedingte Motilitätsverlust in der Abbildung 11. In dem Koordinatenkreuz wurde die Motilität in % des Frischspermas auf der Abszisse aufgetragen, auf der Ordinate die Motilität in % des Kryospermas.

Würde die Motilität durch das Einfrieren nicht verändert werden, so müßten alle Punkte auf der Winkelhalbierenden liegen. Sie liegen jedoch sämtlich unterhalb der Winkelhalbierenden, das heißt, die quantitative Motilitätsrate wird durch den kryobiologischen Einfriervorgang geringer.

Tabelle 2 Spermioqrammwerte des Frisch - Spermas

Versuchs- person	Verfl. Zeit in Min.	ph	Vol.	Besond. Beschaf- fenheit	Anzahl Mill/ ml	Anzahl Mill/ Total	Bewegl. Sperma in %	Qual. d. Motilität
1	6	7,2	1,7	Viskos	29	49	63	1
2	6	7,0	2,8	-	122	281	50	1
3	5	7,0	0,8	-	89,0	71	63	1
4	8	7,0	3,2	-	22	70	54	1
5	7	7,2	3,2	-	47	150	56	1
6	9	7,2	1,5	Viskos	213	323	63	1
7	8	7,2	5,6	-	38	213	69	1
8	10	7,0	3,0	-	37	111	58	1
9	8	7,2	1,6	-	13	21	34	1
10	9	7,2	2,3	-	12	28	59	1
11	10	7,0	1,4	-	32	45	68	1
12	9	7,2	2,0	-	201	402	63	1
13	6	7,0	3,2	-	104	333	68	1
14	8	7,2	1,6	-	225	360	51	1
15	9	7,2	1,9	-	92	175	75	1
16	7	7,2	3,6	-	27	97	63	1
17	10	7,0	1,6	-	87	139	58	1
18	9	7,2	1,8	-	35	63	60	1
19	10	7,0	1,5	-	38	57	69	1
20	7	7,0	1,4	-	82	115	68	1
21	8	7,0	3,5	-	195	683	64	1
22	8	7,0	1,7	-	181	308	73	1
23	10	7,0	2,1	-	115	242	59	1
24	5	7,5	1,9	-	14	27	69	1
25	12	7,0	2,0	Viskos Bakt.	140	280	63	1
26	8	7,2	2,5	-	38	95	73	1
27	9	7,0	1,9	-	30	60	65	1
28	7	7,5	2,0	-	117	234	59	1
29	9	8,0	3,6	-	197	709	62	1
30	7	7,5	0,5	-	11	6	54	1
31	5	7,2	5,3	-	33	175	64	1
32	6	7,2	2,5	-	32	80	64	1
33	8	7,2	1,8	-	31	56	60	1
34	5	7,0	5,7	-	30	171	71	1
35	15	7,2	3,2	-	104	333	48	1

Fortsetzung
Tabelle 2:

Versuchs- person	Verfl. Zeit in Min.	ph	Vol.	Besond. Beschaf- fenheit	Anzahl Mill/ ml	Anzahl Mill/ Total	Bewegl. Sperma in %	Qual. d. Motilität
36	10	7,2	5,0	-	117	585	52	1
37	10	7,7	0,7	-	39	27	49	1
38	11	7,2	2,8	-	45	126	69	1
39	8	7,0	3,6	-	78	281	72	1
40	7	7,0	2,9	-	112	325	63	1
41	9	7,2	2,4	-	86	206	60	1
42	8	7,0	3,1	-	199	617	65	1
43	7	7,2	3,9	-	98	382	72	1
44	10	7,0	4,0	-	11	44	67	1
45	4	7,8	2,1	-	29	61	68	1
46	8	7,0	3,0	-	24	72	21	1
47	7	7,2	2,8	-	4	11	12	2
48	8	7,0	3,1	-	104	322	48	1
49	10	7,0	4,1	-	82	336	32	1
50	10	7,0	2,5	-	67	168	70	1
51	5	7,2	3,5	-	185	648	81	1
52	9	7,2	3,2	-	71	227	63	1
53	8	7,2	3,4	-	95	323	74	1
54	9	7,4	0,9	-	114	103	17	2
55	7	7,4	4,8	-	120	576	54	1
56	5	7,2	6,0	-	141	494	65	1
57	8	7,5	5,3	-	98	519	57	1
58	11	7,8	3,3	-	86	267	67	1
59	5	7,0	5,0	-	65	325	67	1
60	7	7,7	3,0	-	105	315	74	1
61	9	8,0	3,1	-	74	229	43	1
62	10	7,5	1,9	-	121	230	79	1
63	8	7,5	1,2	-	135	262	68	1
64	8	7,2	3,6	-	85	306	74	1
65	8	7,2	3,2	-	26	78	69	1
66	10	7,2	3,2	-	44	141	71	1
67	9	7,2	3,2	-	21	67	75	1
68	7	7,2	4,3	-	45	194	65	1
69	10	7,2	4,0	-	105	42	68	1
70	12	7,5	2,3	-	54	124	68	1
71	8	7,0	2,1	-	48	101	60	1
72	9	7,0	2,1	-	128	269	74	1

Tabelle 3: Gegenüberstellung der quantitativen Motilität von Frisch- und Kryo-Sperma und Überlebensraten in %.

Versuchs- person	Frisch - Sperma	Kryo - Sperma	Überlebensrate von Initialbeweglichkeit in % = $\frac{y_n}{x_n} \times 100\%$
	Bewegliche Sp. in % = x_n	Aufbauergebn.: Bewegl. Sp. in % = y_n	
1	63	50	79,4
2	50	34	68,0
3	63	42	66,7
4	54	45	83,3
5	56	50	89,3
6	63	42	66,7
7	69	51	73,9
8	58	49	75,9
9	34	10	29,4
10	59	42	71,2
11	68	49	72,1
12	63	54	85,7
13	68	52	76,5
14	51	35	68,6
15	75	60	80,0
16	63	51	81,0
17	58	40	69,0
18	60	41	68,3
19	69	59	85,5
20	68	46	67,6
21	64	47	73,4
22	73	60	82,2
23	59	35	59,3
24	69	52	75,4
25	63	50	79,4
26	73	48	65,8
27	65	35	53,8
28	59	47	79,7
29	62	45	72,6
30	54	34	63,0
31	64	41	64,1
32	64	25	39,1
33	60	41	68,3
34	71	55	77,5
35	48	36	75,0

Fortsetzung
Tabelle 3:

Versuchs- person	Frisch - Sperma	Kryo - Sperma		Überlebensrate von der Initialbeweglichkeit in % = $\frac{y_n}{x_n} \times 100$ %
		Aufbauergeb.: Bewegl. Sp. in % = x_n	Bewegl. Sp. in % = y_n	
36	52		28	53,8
37	49		32	65,3
38	69		41	59,4
39	72		35	48,6
40	63		56	88,9
41	60		55	91,7
42	65		31	47,7
43	72		60	83,3
44	67		39	58,2
45	68		15	22,1
46	21		10	47,6
47	12		0	0
48	48		35	72,9
49	32		15	46,9
50	70		51	72,9
51	81		53	65,4
52	63		40	63,5
53	74		36	48,6
54	17		5	29,4
55	54		38	70,4
56	65		27	41,5
57	57		24	42,1
58	67		44	65,7
59	67		49	73,1
60	74		41	55,4
61	43		24	55,8
62	79		59	74,7
63	68		44	64,7
64	74		58	78,4
65	69		52	75,4
66	71		54	76,1
67	75		45	60,0
68	65		42	64,6
69	68		40	58,8
70	68		50	73,5
71	60		33	55,0
72	74		43	58,1

Tabelle 4: Gegenüberstellung der quantitativen Motilität
von Frisch- und Kryosperma und Motilitätsverlustraten

Versuchsperson	Frisch-Sperma Bewegl.Sp.in%=X	Kryo-Sperma Bewegl.Sp.in%=Y	Motilitätsverlust in % = $\frac{Y-X}{X} \cdot 100$ %
1	63	50	20,6
2	50	34	32,0
3	63	42	33,3
4	54	45	16,7
5	56	50	10,7
6	63	42	33,3
7	69	51	26,1
8	58	49	24,1
9	34	10	70,6
10	59	42	41,8
11	68	49	27,9
12	63	54	13,6
13	68	52	23,5
14	51	35	31,4
15	75	60	20,0
16	63	51	19,0
17	58	40	31,0
18	60	41	31,7
19	69	59	14,5
20	68	46	32,4
21	64	47	26,6
22	73	60	17,8
23	59	35	40,7
24	69	52	24,6
25	63	50	20,6
26	73	48	34,2
27	65	35	46,2
28	59	47	20,3
29	62	45	27,4
30	54	34	37,0
31	64	41	35,9
32	64	25	60,9
33	60	41	31,7
34	71	55	22,5
35	48	36	25,0

Fortsetzung - Tabelle 4

Versuchsperson	Frisch-Sperma Bewegl.Sp. in %	Kryo-Sperma Bewegl.Sp. in %	Motilitäts- verlust in %
36	52	28	46,2
37	49	32	34,7
38	69	41	40,6
39	72	35	51,4
40	63	56	11,1
41	60	55	8,3
42	65	31	52,3
43	72	60	16,7
44	67	39	41,8
45	68	15	77,9
46	21	10	52,4
47	12	0	100,0
48	48	35	27,1
49	32	15	53,1
50	70	51	27,1
51	81	53	34,6
52	63	40	36,5
53	74	36	51,4
54	17	5	70,6
55	54	38	29,6
56	65	27	58,5
57	57	24	57,9
58	67	44	34,3
59	67	49	26,9
60	74	41	44,6
61	43	24	44,2
62	79	59	25,3
63	68	44	35,3
64	74	58	21,6
65	69	52	24,6
66	71	54	23,9
67	75	45	40,0
68	65	42	35,4
69	68	40	41,2
70	68	50	26,5
71	60	33	45,0
72	74	43	41,9

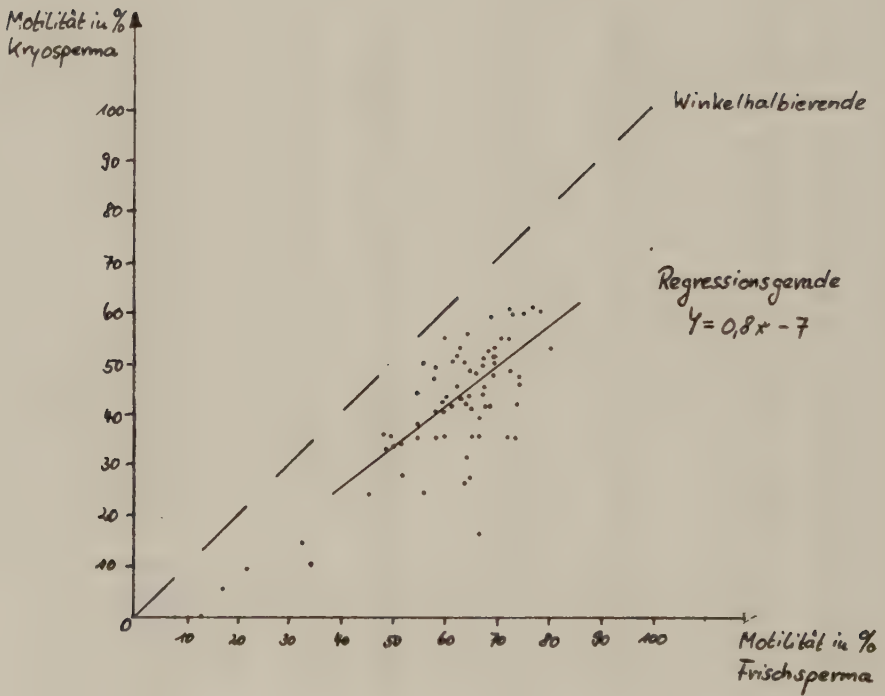


Abbildung 11: Die Regressionsgerade stellt den quantitativen Motilitätsverlust der kryobiologisch behandelten Ejakulate dar.

Die maschinell errechnete Regressionsgerade hat die Gleichung

$$Y = 0,8 X - 7$$

Die Regressionsgerade ist somit nahezu parallel zur Winkelhalbierenden. Die durchschnittlichen qualitativen Motilitätsraten von Frisch-Sperma liegen zwischen 45 und 80 %, somit lassen sich mit der Gleichung der Regressionsgeraden die durchschnittlichen Motilitätsverluste berechnen.

Durch den kryobiologischen Einfrier- und Auftauprozeß müssen durchschnittlich Motilitätsverluste zwischen 16 und 23 % hingenommen werden. Die durchschnittlichen Überlebensraten betragen zwischen 77 und 84 %.

Wenn man die Auftauergebnisse und Überlebensraten der Spermien nach der Tiefkühlbehandlung betrachtet, fallen fünf Fälle besonders auf. Die Versuchspersonen mit der Nummer 9, 32, 45, 47 und 54 imponieren mit überdurchschnittlich niedrigen Überlebensraten, die zwischen 0 und 39,1 liegen. Die Ejakulate der Versuchspersonen mit der Nummer 9, 47 und 54 weisen bezüglich der Anzahl der Spermien, als auch in der quantitativen Motilität des Frisch-Spermas ein pathologisches Spermogramm auf. In Übereinstimmung mit der Literatur (63) wird deutlich, daß sich nach den Spermogrammkriterien minderwertiges Ejakulat nicht für eine Kryospermakonservierung eignet. Die Ejakulate der Versuchspersonen 32 und 45 fallen ebenfalls mit überdurchschnittlich niedrigen Überlebensraten, bedingt durch die Einfrierbehandlung, auf. Beide besitzen zwar ein quantitativ und qualitativ gutes Ejakulat, trotzdem ist der Motilitätsverlust ähnlich hoch wie bei minderwertigen Ausgangsqualitäten. Die praktischen Erfahrungen mit der Kryospermakonservierung zeigen, daß es möglicherweise besonders kryolabile Spermatozoen gibt, die sich für eine Kryospermabehandlung nicht eignen. Aufgabe weiterer Forschungsarbeiten ist es, diese Beobachtung zu sichern

und zu erklären.

3.2. Vergleich von Frisch- und Kryosperma im gekreuzten Invasionstest nach KURZROK-MILLER

Wie bereits beschrieben, wurden zwei Testreihen durchgeführt. Der Zervixschleim A wurde 72-mal mit Frischsperma und anschließend 72-mal mit Kryosperma im gekreuzten Invasionstest geprüft. Das gilt auch für den Zervixschleim B.

In der Tabelle 5 sind die detaillierten Ergebnisse der gekreuzten Invasionstests aufgeführt. In den Zervixschleim A penetrierten 66 Frischspermaproben. Kein Penetrationsverhalten zeigten 6 Frischspermaproben und somit einen negativen KURZROK-MILLER-Test. Der Vergleich mit den Kryospermaproben erbrachte, daß ebenfalls 66 Ejakulatproben penetrierten und wiederum die bereits als Frischsperma nicht penetrierfähigen Ejakulatproben auch als Kryosperma keine Penetrationsfähigkeit aufwiesen. Somit resultiert eine absolute Übereinstimmung des Penetrationsverhaltens, geprüft mit dem KURZROK-MILLER-Test, zwischen Frisch- und Kryosperma. Im Vierfeldertest (Tabelle 6) wird statistisch signifikant deutlich, daß ohne Ausnahme das Penetrationsverhalten durch den kryobiologischen Einfriervorgang nicht beeinflußt wird.

Betrachtet man die als Frisch- und Kryospermaproben im Invasionstest negativen Ejakulatproben (VP 9, 25, 46, 47, 54, 55) und deren Spermiogrammwerte, so müssen VP 9, 46, 47 und 54 nach den Spermiogrammkriterien als minderwertige Ejakulatproben bezeichnet werden. Somit konnte übereinstimmend mit der Literatur notiert werden, daß minderwertige Ejakulate häufig kein Penetrationsverhalten zeigen. FJÄLLBRANDT (31), KREMER (55) und ULSTEIN (143) konnten in ihren Arbeiten zeigen, daß zwischen Penetrationsfähigkeit, Motilität der Spermien und Anzahl der Spermien eine signifikante Korrelation besteht. Die Ejakulatproben der Versuchspersonen 25 und 55 hatten ebenfalls negative Invasionsergebnisse, jedoch ist deren Spermiogrammbefund im Normbereich. Ein biologisch, womög-

Tabelle 5: Detaillierte Ergebnisse des gekreuzten Invasionstestes nach KURZROK-MILLER mit Frisch- und Kryosperma

Versuchs- person	Zervix - Schleim A		Zervix - Schleim B	
	Frisch-Sperma pos. neg.	Kryosperma pos. neg.	Frisch-Sperma pos. neg.	Kryosperma pos. neg.
1	+	+	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	-	-
4	+	+	-	-
5	+	+	-	-
6	+	+	-	-
7	+	+	-	-
8	+	+	-	-
9		-	-	-
10	+	+	-	-
11	+	+	-	-
12	+	+	-	-
13	+	+	-	-
14	+	+	-	-
15	+	+	-	-
16	+	+	-	-
17	+	+	-	-
18	+	+	-	-
19	+	+	-	-
20	+	+	-	-
21	+	+	-	-
22	+	+	-	-
23	+	+	-	-
24	+	+	-	-
25		-	-	-
26	+	+	-	-
27	+	+	-	-
28	+	+	-	-
29	+	+	-	-
30	+	+	-	-
31	+	+	-	-
32	+	+	-	-
33	+	+	-	-
34	+	+	-	-
35	+	+	-	-

Fortsetzung
Tabelle 5:

Versuchs- person	Zervix - Schleim A		Zervix - Schleim B	
	Frisch-Sperma pos. neg.	Kryosperma pos. neg.	Frisch-Sperma pos. neg.	Kryosperma pos. neg.
37	+	+	-	-
38	+	+	-	-
39	+	+	-	-
40	+	+	-	-
41	+	+	-	-
42	+	+	-	-
43	+	+	-	-
44	+	+	-	-
45	+	+	-	-
46	-	-	-	-
47	-	-	-	-
48	+	+	-	-
49	+	+	-	-
50	+	+	-	-
51	+	+	-	-
52	+	+	-	-
53	+	+	-	-
54	-	-	-	-
55	-	-	-	-
56	+	+	-	-
57	+	+	-	-
58	+	+	-	-
59	+	+	-	-
60	+	+	-	-
61	+	+	-	-
62	+	+	-	-
63	+	+	-	-
64	+	+	-	-
65	+	+	-	-
66	+	+	-	-
67	+	+	-	-
68	+	+	-	-
69	+	+	-	-
70	+	+	-	-
71	+	+	-	-
72	+	+	-	-

positiv = massenhafte Invasion von Spermien in den Zervixschleim

Tabelle 6:

Vierfeldertest Zervix-Schleim A

Zervix - Schleim A

Penetrationsverhalten des Kryospermas

		positiv	negativ	
Penetrationsver- halten des Frischspermas	positiv	66	0	66
	negativ	0	6	6
		66	6	72

Tabelle 7:

Vierfeldertest Zervix - Schleim B

Zervix - Schleim B

Penetrationsverhalten des Kryospermas

		positiv	negativ	
Penetrationsver- halten des Frischspermas	positiv	0	72	0
	negativ	72	0	72
		0	72	72

lich immunologisch bedingter Spermaschaden dürfte hier verursachend sein.

Der Zervixschleim B, der ebenfalls mit 72-Frisch- und Kryospermaproben untersucht wurde, zeigte bei sämtlichen Frischsperma-Invasionstesten einen negativen KURZROK-MILLER-Test. Die untersuchten präovulatorischen Kriterien, Basaltemperatur und der auf die Ovulation hinweisende Temperaturanstieg, die mikroskopische und makroskopische Beschaffenheit des Zervikalsekretes, die Spinnbarkeit und der Farnkrauttest waren entsprechend den präovulatorischen Kriterien. Eine Verifikation des präovulatorischen Termins mittels Hormonanalysen und auch eine mikrobiologische Untersuchung des Zervikalsekretes, um gegebenenfalls eine venerische Infektion nachzuweisen, konnten nicht unternommen werden, da bereits alle 72 Frischejakulatspender zu diesem Termin einbestellt waren. Der Zervixschleim B wurde trotz seiner Nichtpenetrierbarkeit in die Studie aufgenommen. Da sämtliche Frischspermaproben nicht penetrierten, sollte ausgeschlossen werden, daß mit Kryospermaproben falsche positive Ergebnisse entstehen, also Ejakulatproben nach der Tiefkühlbehandlung plötzlich positive Ergebnisse im KURZROK-MILLER-Test zeigen. Erwartungsgemäß waren sämtliche 72 Kryospermaproben ebenfalls negativ in ihrem Penetrationsverhalten. Somit konnte im Vierfeldertest (Tabelle 7) mit statistisch signifikanter Bedeutung eine absolute Übereinstimmung zwischen Frisch- und Kryosperma im gekreuzten Invasionstest nach KURZROK-MILLER festgestellt werden.

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Mit der beschriebenen kryobiologischen Einfrieremethode entstehen bei einzufrierenden Ejakulatproben quantitative Motilitätsverluste zwischen 16 und 23 %. Nach den Spermiogrammkriterien minderwertiger Ejakulatproben eignen sich nicht für eine kryotechnische Behandlung.

2. Die experimentelle Überprüfung der Frisch- und Kryosperma im gekreuzten Invasionstest nach KURZROK-MILLER ergab eine absolute, statistisch gesicherte Übereinstimmung im Penetrationsverhalten. Es darf also aus den Ergebnissen geschlossen werden, daß sich Kryospermakonserven genauso wie Frischspermaproben zum Invasionstest nach KURZROK-MILLER verwenden lassen.

Die Penetrationsfähigkeit, gemessen im KURZROK-MILLER-Test, wird durch den kryobiologischen Einfrier- und Auftauvorgang nicht beeinflusst.

4. Diskussion

Anhand von 72 verschiedenen Ejakulatproben wurde mit Frisch- sowie mit Kryosperma ein gekreuzter Invasions-test nach KURZROK-MILLER jeweils zu dem gleichen Zervixschleim durchgeführt. Zwei Testserien wurden durchgeführt, je eine zu dem Zervixschleim A und B.

Ein Ergebnis dieser vorliegenden Arbeit ist, daß bei kryobiologisch konservierten Ejakulaten mit einem durchschnittlichen quantitativen Motilitätsverlust von 16 - 23 % nach dem Auftauen gerechnet werden muß. Die Schwankungsbreite der Überlebensrate streut von 0 - 91,7 %. Bei genauerer Analyse der Motilitätsraten der Kryospermaproben konnte bestätigt werden, daß sich nach den Spermio-grammkriterien minderwertige Ejakulatproben nicht für eine kryobiologische Behandlung eignen, da bei niedrigen quantitativen Motilitätsraten des Frisch-Spermas eine weitere Reduktion, bedingt durch die kryobiologische Konservierungstechnik, entsteht. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen gibt ULSTEIN (141) (142) (143) eine Reduktion der Motilitätsraten nach einer Einfrierbehandlung zwischen 15 und 20 % an. Die Überlebensraten variieren bei ULSTEIN zwischen 11 und 89 %; Ejakulatproben mit einer Initialbeweglichkeit des Frisch-Spermas ≥ 50 % hatten eine Überlebensrate, die signifikant höher lag, als die Ejakulatproben mit einer Initialbeweglichkeit ≤ 50 %.

die Hypothese, die dieser Arbeit zugrunde lag, daß die Penetrationsfähigkeit, gemessen mit dem Kurzrok-MILLER-Test, durch den Einfrier- und Auftauprozess nicht beeinflusst wird, konnte statistisch signifikant gesichert werden. Im Vierfeldertest konnte ohne Ausnahme gezeigt werden, daß Frisch-Spermaproben, die in den Zervixschleim penetrierten, diese Fähigkeit auch als Kryospermaproben behalten. Umgekehrt, Frischspermaproben, die nach dem Invasions-test negativ bewertet wurden, zeigten nach der kryobiologischen Behandlung wiederum ein negatives Inva-

sionsverhalten. Hieraus darf geschlossen werden, daß Kryospermaproben bei der Untersuchung von infertilen Ehepaaren zum gekreuzten Invasionstest nach KURZROK-MILLER genauso wie Frisch-Sperma verwendet werden können.

Die Korrelation zwischen Penetrationsfähigkeit der Spermatozoen und Fertilität ist signifikant höher als alle anderen Korrelationen zwischen den Parametern Volumen des Ejakulates, Dichte, Motilität der beweglichen Spermien, qualitativer Grad der Motilität, Prozentsatz an abnormen Spermatozoen, Konzentration von Fruktose im Ejakulatplasma und Fertilität; dies berichtet ULSTEIN in ihrer Arbeit (142). Wegen dieser wichtigen Beziehung zwischen Penetrationsfähigkeit und Fertilität sind Invasionstests zur Untersuchung von infertilen Ehepaaren notwendig.

Diskutiert werden muß noch das Ergebnis dieser Arbeit, daß sich durch die kryobiologische Behandlung das Penetrationsverhalten nicht ändert. ULSTEIN (137) (138) (139) (140) (141) (142) (143) untersuchte in ihren Arbeiten ebenfalls das Penetrationsverhalten von Frisch- und Kryosperma und berichtet, daß die Penetrationsfähigkeit von Kryosperma sich ändert. Die Schwankungen der Penetrationsänderungen liegen bei ULSTEIN zwischen 0 und 100 %, das heißt, teilweise blieben die Kryospermaproben in ihrem Penetrationsverhalten unbeeinflusst, teilweise verlieren sie ihre Penetrationsfähigkeit vollkommen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen FJÄLLBRANDT und ACKERMANN (31). Diese Autoren untersuchten das Penetrationsverhalten mit dem von KREMER (67) (68) entwickelten SPM-Test (sperm-penetration-meter), auch capillary-tube-method genannt. Mit diesem Test kann nicht nur die Penetrationsfähigkeit an sich, sondern auch die Penetrationsstrecke objektiviert werden, sie wird in mm angegeben. Eine 5 mm Penetrationsstrecke wird als unbedingt notwendige Distanz für Fertilität erachtet (31), qualitativ gute Ejakulate penetrieren jedoch mehr als 15 und über 20 mm hinaus. Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse von ULSTEIN

fällt auf, daß bereits die Frischejakulate, die nach der Kryobehandlung ihre Penetrationsfähigkeit vollständig verloren, nach Spermiogrammkriterien eine minderwertige Qualität aufwiesen.

Möglicherweise läßt sich auch so der Unterschied zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und den Arbeiten von ULSTEIN erklären, da minderwertige Ejakulatproben bereits als Frischsperma negative Testergebnisse im KURZROK-MILLER-Test zeigen, im SPM-Test jedoch geringe Penetrationsstrecken aufweisen, diese nach einer Kryospermaprobebehandlung letztendlich verlieren. FJÄLLBRANDT (31) beobachtete ebenfalls mit der capillary-tube-method eine Minderung der Penetrationsfähigkeit, jedoch fielen die Penetrationsstrecken des Kryosperma niemals unter die Fertilitätsgrenzen. Die Fähigkeit zur Penetration an sich blieb allen Kryospermaproben erhalten; diese Arbeit stimmt mit der vorliegenden Arbeit überein, obwohl verschiedene Invasionsteste angewandt wurden.

KREMER (68) verglich die Ergebnisse des Invasionstests nach KURZROK-MILLER und des Sperm-penetration-meter-Tests miteinander und fand eine gute Übereinstimmung, besonders wenn die Anzahl der penetrierten Spermien bei dem KURZROK-MILLER-Test mit in die Ergebnisbeurteilung aufgenommen wird. In dieser Arbeit hatte der KURZROK-MILLER-Test den entscheidenden Vorteil, daß alle 72 Versuchspersonen als Frisch- und Kryospermaproben mit dem gleichen Zervixschleim getestet werden konnten, da für diesen Test nur sehr geringe Mengen an Zervixschleim pro Versuch benötigt werden.

5. Zusammenfassung

72 verschiedene Ejakulatproben wurden als Frisch- sowie als Kryosperma im gekreuzten Invasionstest nach KURZROK-MILLER getestet.

Die experimentelle Überprüfung der Frisch- und Kryosperma

im gekreuzten Invasionstest nach KURZROK-MILLER ergab eine absolute, statistisch gesicherte Übereinstimmung im Penetrationsverhalten. Es darf aus den Ergebnissen geschlossen werden, daß sich Kryospermakonserven genauso wie Frischspermaproben zum gekreuzten Invasionstest nach KURZROK-MILLER verwenden lassen. Die Penetrationsfähigkeit, gemessen im KURZROK-MILLER-Test, wird durch den kryobiologischen Einfrier- und Auftauvorgang nicht beeinflußt.

Weiterhin konnte festgestellt werden, daß mit der beschriebenen biologischen Kryotechnik bei einzufrierenden Ejakulaten quantitative Motilitätsverluste zwischen 16 und 23 % entstehen.

6. Literaturverzeichnis

1. ANSBACHER, R.:

Bilateral vas ligation: sperm antibodies.
Contraception , 3, 227, 1974

2. ASCH, R.H.:

Laparoscopic recovery of sperm from peritoneal
fluid, in patients with negative or poor Sims-Huhner
test.
Fertility and Sterility, 9, 1111, 1976

3. AX, R.L. and J.R. LODGE:

Rooster Spermatozoan Motility, Forward progression and
fertility after Storage at 25,5 or -196°C in various extend
Cryobiology, 12, 93, 1975

4. BARKAY, J., H. ZUCKERMAN and M. HEIMAN:

A New practical method of freezing and storing human
sperm and a preliminary report on its use.
Fertility and Sterility, 25, 399, 1974

5. BARKAY, J., H. ZUCKERMAN, D. SKLAN and S. GORDON:

Effect of caffeine on increasing the motility of frozen
human sperm.
Fertility and Sterility, 2, 175, 1977

6. BECK jr., W.W.:

A critical look at the legal, ethical and technical
aspects of artificial insemination.
Fertility and Sterility, 1, 1, 1976

7. BERHMAN, S.J. and M.D. SAWADA:

Heterologous and homologous inseminations with human
semen frozen and stored in a liquid-nitrogen
refrigerator.
Fertility and Sterility, 17, 457, 1966

8. BEHRMAN, S.J. and D.R. ACKERMAN:
Freeze preservation of human sperm.
Amer. J. Obstetr. Gynec., 103, 654, 1969
9. BENVENISTE, D., H. REBBE and J.E.P. PEDERSEN:
A mucus aspirator for the postcoital Test.
Fertility and Sterility, 5, 599, 1976.
10. BERGMANN, P.:
Spermigration and cyclic changes in cervical mucus.
Fertility and Sterility, 3, 183, 1953
11. BERGMANN, P.:
Spermigration and its relation to the morphology and
motility of spermatozoa.
International Journal of Fertility, 1, 45, 1955
12. BOTELLA-LLUSIA, J.:
Measurement of linear progression of the human
spermatozoan as an index of male fertility.
International Journal of Fertility, 1, 113, 1956
13. BOTELLA-LLUSIA, J. and V. RIUZ-VELASCO:
Postcoital test in vitro.
International Journal of Fertility, 5, 301, 1960
14. BRANDL, E. and L. METTLER:
Timing of ovulation in a sterility clinic.
International Journal of Fertility, 19, 13, 1974
15. BREGULLA, K. and R. SADOWSKI:
Die Insemination. Indikation, Technik, Ergebnisse.
Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 32, 802, 1972
16. BREGULLA, K.:
Zyklusstörungen.
Fortschritte der Medizin, 20-21, 835, 1974

17. BRIGGS, M.:
Tetracycline and steroid hormone binding to human spermatozoa.
Acta endocrinologica, 4, 785, 1974
18. BROGAARD HANSEN, K.:
A comparative study of various methods for the detection of spermatozoal antibodies.
Acta Obstet Gynec Scand, 53, 69, 1975
19. CAMPOS DA PAZ, A.:
The crystallization test as a guide to the treatment of cervical hostility.
Fertility and Sterility, 4, 137, 1953
20. CARLBORG, L.:
Determination of sperm migration rate in small samples of cervical mucus.
Acta endocrinologica, 62, 732, 1969
21. CASTENHOLZ, A.:
Photokymographische Registriermethode zur Darstellung und Analyse der Spermatozoenbewegungen.
Andrologia, 2, 155, 1974
22. CHECK, J.H. and A.E. Radoff:
Treatment of cervical factor by donor mucus insemination.
Fertility and Sterility, 1, 113, 1977
23. COHEN, M.R., I.F. STEIN and B.M. KAYE:
Optimal time for therapeutic insemination.
Fertility and Sterility, 2, 141, 1956
24. DAVID, A. and D. AVIDAN:
Artificial insemination donor: clinical and psychologic aspects.
Fertility and Sterility, 5, 528, 1976

25. DHOM, G. und F. STÄDTLER:
Die kinderlose Ehe: Männliche Infertilität:
Fortschritte der Medizin, 27, 91, 1973
26. DIXON, R.E., V.C. BUTTRAM jr. and C.W. SCHUM:
Artificial insemination using homologous semen:
a review of 158 cases.
Fertility and Sterility, 6, 647, 1976
27. DIXON, R.E. and V.C. BUTTRAM jr.:
Artificial insemination using donor semen:
a review of 171 cases.
Fertility and Sterility, 2, 130, 1976
28. FJÄLLBRANDT, B.:
Immunoagglutination of sperm in cases of sterility.
Acta Obstet Gynec Scand, 44, 474, 1965
29. FJÄLLBRANDT, B.:
Sperm antibodies and sterility in men.
Acta Obstet Gynec Scand, Vo. XLVII, Supplement 4, 1968
30. FJÄLLBRANDT, B.:
Interrelation between high levels of sperm
antibodies, reduced penetration of cervical mucus
by spermatozoa and sterility in men.
Acta Obstet Gynec Scand, 47, 102, 1968
31. FJÄLLBRANDT, B. and D.R. ACKERMANN:
Cervical mucus penetration in vitro by fresh
and frozen-preserved human semen specimens.
Journal of Reproduction and Fertility, 20, 515, 1969
32. FRANKEL, M.:
Role of semen cryobanking in american medizine.
British Medical Journal, 3, 619, 1974

33. FREDRICSSON, B.:
Laparoscopy versus culdoscopy in the investigation
of infertility.
Acta Obstet Gynec Scand, 2, 53, 1974
34. FRIBERG, J. and H. GUARPE:
Mycoplasmas in semen from fertile and infertile men.
Andrologia, 6, 1, 1974
35. FURUHJELM, M., K. CARLSTROÖM and B. JONSON:
Endocrinological aspects of male infertility.
Acta Obstet Gynec Scand, 2, 53, 1974
36. GINER, J., G. MERINO, J. LUNA and R. AZUAR:
Evaluation of the Sims-Huhner postcoital test in
fertile couples.
Fertility and Sterility, 2, 145, 1974
37. GLATTHAAR, E.:
Probleme der heterologen artifiziellen Insemination.
Schweizerische Med. Wochenschrift, 14, 101, 1971
38. GLAUB, J.C., R.N. MILLS and D.F. KATZ:
Improved motility recovery of human spermatozoa
after freeze preservation via a new approach.
Fertility and Sterility, 11, 1283, 1976
39. GRADL, T. and L. METTLER:
Crossed immunelektrophoresis of sperm antibodies
in human serum and cervical mucus.
International Journal of Fertility, 20, 50, 1975
40. GROSSGEBAUER, K. und R. KADEN:
Bakteriologische Untersuchungen an menschlichen
Ejakulaten.
Arch. Hyg., 154, 158, 1970
41. HEITE, H.J., G. VOGEL und H. WELTE:
Vortrag zur 2. Jahrestagung der Arbeits-Gemeinschaft
für Dermatologische Forschung, 1975

42. HERRMANN, W.P.:
Immunologische Charakterisierung menschlicher
Spermaplasmaproteine.
Andrologie, 1, 11, 1969
43. HILFRICH, H.J.:
Immunologische Probleme der Sterilität.
Fortschr. Med., 27, 91, 1973
44. HORNE, H.W., R.B. KUNDSIN and T.S. KOSASA:
The role of mycoplasma infection in human reproductive
failure.
Fertility and Sterility, 4, 380, 1974
45. HUHNER, M.:
Sterility in the male and female and its treatment.
Rebman Co., New York, 1913
46. HUSTED, S.:
Sperm antibodies in men from infertile couples.
International Journal of Fertility, 20, 113, 1975
47. ISOJIMA, S. and Y. ASKITAKA:
Immunologic analysis of sperm-immobilising factor
found in sera of women with unexplained sterility.
Amer. J. Obstet. Gynec., 101, 677, 1968
48. ISOJIMA, S., K. TSUCHIYA, C. TAMAKA, O. NAKA and
H. ADACHI:
Further studies on sperm-immobilising antibody found
in sera of unexplained cases of sterility in women.
Amer. J. Obstet. Gynec., 112, 199, 1972
49. JECHT, E.W. and J.J. RUSSO:
A System for the quantitative analysis of human sperm
motility.
Andrologie, 3, 215, 1973
50. JECHT, E.W. and C.H. POON:
Preparation of sperm-free seminal plasma from human
semen.
Fertility and Sterility, 1, 1, 1975

51. JOEL, C.a. and J. BOTELLA-LLUSIA:
Principles of Modern Semen examination and Botella-Casares Test.
In: Fertility Disturbances in Men and Women,
pp. 75 - 106, Karger, Basel 1971
52. JOEL, C.A.:
Diagnosis of Male Fertility Disturbances.
In: Fertility Disturbances in Men and Women,
pp. 107 - 123. Karger, Basel 1971
53. JOEL, C.A.:
The Post Coital Test.
In: Fertility Disturbances in Men and Women,
pp. 124 - 126, Karger, Basel 1971
54. JORDAN, P. and H. NIERMANN:
Entwicklung und gegenwärtiger Stand der Andrologie
in Deutschland.
Andrologie, 1, 3, 1969
55. KADEN, R.:
Kryosperma zur Insemination.
Vortrag, Sitzung Dtsch.Gesellsch. für Familien-
planung Berlin 1970
56. KADEN, R.:
Diagnostik andrologischer Störungen in Praxis
und Klinik.
Der Urologe, 1, 6, 1970
57. KADEN, R., K. SPERLING und K. GROSSGEBAUER:
Andrologische Fortschritte bei Störungen der
Zeugungsfähigkeit.
In: Schirren, C., Hersg. Fortschritte der Andrologie
Grosse Verlag, Berlin, 3, 11, 1974
58. KADEN, R. und P. MORTLER:
Einführung in die andrologische Labordiagnostik
bei Fortpflanzungsproblemen des Menschen.
Die Berliner Ärztekammer, 8, 270, 1970
6, 154, 1971

59. KADEN, R., K. GROSSGEBAUER, K. SPERLING und K. SOKOL:
Kryospermaforschung und andrologische Therapie.
Archiv für Dermatologische Forschung, 244, 443, 1972
60. KADEN, R.:
Praxisnahe Methodik bei Fortpflanzungsproblemen
des Mannes.
Berliner Jahrbuch für ärztliche Fortbildung, 1972
61. KADEN, R.:
Andrologische Methodik bei Fortpflanzungsproblemen
des Menschen.
Med. Welt, 23, 107, 1972
62. KADEN, R.:
Andrologische Laboruntersuchungen.
Diagnostik, 6, 590, 1973
63. KADEN, R.:
Zur Einfrierbarkeit von Humansperma.
Sexualmedizin, 2, 185, 1973
64. KADEN, R.:
Reproduktions- und Kohabitationsstörungen aus
andrologischer Sicht.
Fortschritte der Medizin, 34, 2031, 1976
65. KINLOCH NELSON, C.M. and R.G. BUNGE:
Semen analysis: evidence for changing parameters of
male fertility potential.
Fertility and Sterility, 6, 25, 1974
66. KOSASKY, H.J.:
Viskosimeter
In: Kongreßbericht Medical Tribune, 25, 50, 1976
67. KREMER, J.:
A simple sperm penetration test, Preliminary report.
International Journal of Fertility, 4, 209, 1965

68. KREMER, J.:
The in vitro spermatozoal penetration test in fertility investigations.
Dissertation, Rijksuniversiteit te Groningen, 1968
69. KREMER, J. and S. JAGER:
The sperm-cervical mucus contact test: a preliminary report.
Fertility and Sterility, 3, 335, 1976
70. KRETZER, de, D.M.:
The regulation of male fertility, the State of the art and future possibilities.
Contraception, 6, 561, 1974
71. KURZROK, R. and E.G. MILLER:
Biochemical studies of human semen and its relation to mucus of the cervix uteri.
American Journal of Obstetrics and Gynecology, 15, 56, 1928
72. KURZROK, R. and C. BIRNBERG:
A study of semen mucus penetration and its relation to a test for ovulation.
International Journal of Fertility, 1, 134, 1958
73. LAMAR, J., L. SHETTLER and E. DELFS:
Cyclic penetrability of human cervical mucus to spermatozoa in vitro.
Am. J. Physiol., 129, 234, 1940
74. LANDES, E. und H. Müller
Männliche Fertilitätsstörungen, Prophylaxe, Diagnostik und Therapie aus andrologischer Sicht.
Fortschr. Med., 4, 91, 1973
75. LEHMANN, F., D. MASSON, D. KREBS und B. BÜDEL:
Zur diagnostischen Situation bei immunologisch bedingter Sterilität.
Fortschr. Med., 27, 91, 1973

76. LESLIE, W., G. QUINLIVAN and H. SULLIVAN:
Antispermatozoal immunglobulin G in the sera
of subfertile men.
Fertility and Sterility, 4, 399, 1976
77. LESLIE, W. and G. QUINLIVAN:
Antispermatozoal effects of human seminal plasma -
an immunologic phenomenon.
Fertility and Sterility, 10, 1194, 1976
78. LIS van, J.M.J., J. WAGENAAR and J.R. SOER:
Sperm-agglutinating activity in serum of vasectomized
men.
Andrologia, 2, 129, 1974
79. LÜBKE, F.:
Über die Problematik psychischer Gesichtspunkte
bei der Behandlung steriler Ehepaare.
Andrologia, 1, 2, 1969
80. LÜBKE, F., E. LORENZ, M. SCHMIDT-GOLLWITZER und
M. STAUBER:
Sterilitätsforschung, Arbeitsbericht über "Sprechstunden
für kinderlose Ehepaare".
Presse- und Informationsdienst der Freien Universität
Berlin, 6, 1, 1972
81. LÜBKE, F. und E. LORENZ:
Qualitätskontrolle fertilen und subfertilen Kryospermas
unter dem Aspekt therapeutischer Insemination.
Arch. Dermatolog. Forschung, 244, 447, 1972
82. MAC LEOD, J. and R.Z. GOLD:
The male factor in fertility and infertility.
Fertility and Sterility, 1, 10, 1953
83. MAC LEOD, J., R.Z. GOLD and C.M. MAC LANE:
Correlation of the male and female factors in
human infertility.
Fertility and Sterility, 2, 112, 1955

84. MAC LEOD, J.:
The Semen Quality in Relation to Male Infertility.
In: Fertility Disturbances in Men and Women,
pp. 127 - 134, Karger, Basel 1971
85. MAKLER, A.:
A new method for evaluation cervical penetrability
using daily aspirated and stored cervical mucus.
Fertility and Sterility, 5, 533, 1976
86. MANCINI, R.E.:
Immunological factors and Intertility.
In: Fertility Disturbances in Men and Women,
pp. 189 - 205, Karger, Basel 1971
87. MANSOORI, A.G.:
Kinetics of water loss from cells at subzero
centigrade Temperatures.
Cryobiology, 12, 31, 1975
88. MARCUS, Z.H., L. NEBEL, Y. STAHL and G. DOMINGUE:
Studies on sperm antigenicity. In vivo and in vitro
cellular reactivity in guinea pigs sensitized with
fractions of human spermatozoa.
Fertility and Sterility, 6, 713, 1976
89. MATHESON, G., L. CARLBORG and C. GEMZELL:
Frozen human semen for artificial insemination.
Am. J. Obstet. Gynec., 104, 495, 1969
90. MAUSS, J., G. BÖRSCH and L. TÓRÓK:
Differential diagnosis of low or absent seminal
fructose in man.
Fertility and Sterility, 5, 411, 1974
91. METTLER, L. und P. SCHEIDEL:
Sensibilisierung gegen Sperma-Antigene.
Forsch. Med. 27, 91, 1973

92. METTLER, L., P. SCHEIDEL, B. MESECK-SELCHOW und D. SHIRWANI:
Spermaantikörper im Serum steriler und infertiler Frauen.
Andrologia, 1, 87, 1974
93. METTLER, L., P. SCHEIDEL and D. SHIRWANI:
Sperm Antibody Production in female Sterility.
International Journal of Fertility, 1, 7, 1974
94. MILLER, E.G. and R. KURZROK:
Biochemical Studies of human semen III. Factors affecting migration of sperm through the cervix.
Am. J. Obst. Gynec., 24, 19, 1932
95. MOGHISSI, K.S.:
Postcoital test: Physiologic basis, technique and interpretation.
Fertility and Sterility, 2, 117, 1976
96. PETRUMIA, D.M., P.J. TAYLOR and J.I. WATSON:
A comparison of methods of screening for sperm antibodies in the serum of women with otherwise unexplained infertility.
Fertility and Sterility, 6, 655, 1976
97. POLGE, C., A.U. SMITH and A.S. PARKES:
Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.
Nature, 164, 666, 1949
98. RIUZ-VELASCO, V.:
A quantitative spermatocidal penetration test.
International Journal of Fertility, 7, 11, 1962.
99. RUMKE, P., N. van AMSTEL, E.N. MESSER and P.D. BEZEMER:
Prognosis of fertility of men with sperm agglutinins in the serum.
Fertility and Sterility, 5, 393, 1974

100. SAWADA, Y., D. ACKERMAN and S.J. BERHMANN:
Motility and respiration of human spermatozoa
after cooling to various low temperatures.
Fertility and Sterility, 18, 775, 1967
101. SCHAAD, G.:
Über die therapeutische heterologe Insemination
in Deutschland.
Schles.-Holst. Ärztebl., Jan., 1970
102. SCHILL, W.B.:
Anwendungsmöglichkeiten der humanen Spermakonser-
vierung.
Therapie der Gegenwart, 111, 1590, 1972
103. SCHILL, W.B.:
Humane Spermakonservierung und therapeutische
Ausblicke.
Der Hautarzt, 23, 525, 1972
104. SCHILL, W.B.:
Der Cervixmucus und seine Bedeutung für die
Andrologie.
Der Hautarzt, 10, 417, 1973,
11, 469, 1973
105. SCHILL, W.B.:
Der Einfluß der kryobiologischen Behandlung von
Humansperma auf die Aktivität der akrosomalen
Protase Akrosin.
Andrologie, 4, 333, 1973
106. SCHILL, W.B.:
Homologe Insemination von gepooltem Sperma.
Der Hautarzt, 25, 310, 1974
107. SCHILL, W.B. und G. HABERLAND:
In vitro Untersuchungen zur Frage der Wirkung von
Kallikrein und Kininen auf die Spermatozoenmotilität.
Der Hautarzt, 25, 245, 1974
108. SCHIRREN, C.:
The Fertility of Man - Basic Research and Clinical
Aspects.
Fortschr. Andrologie, 1, 2, 1970

109. SCHIRREN, C.:
Die kinderlose Ehe.
Fortschr. Med., 88, 1047, 1970
110. SCHWARTZ, R. and H. LINSSER:
Sperm motility: A simple method for analysis.
Am. J. Med. 17, 124, 1954
111. SCHWARTZ, R. and H. LINSSER:
Some factors modifying sperm progression.
Fertility and Sterility, 6, 450, 1955
112. SHERMAN, J.K.:
Freezing and freeze-drying of human spermatozoa.
Fertility and Sterility, 5, 357, 1954
113. SHERMAN, J.K.:
Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying.
Fertility and Sterility, 14, 49, 1963
114. SHERMAN, J.K.:
Questionable protection by intracellular glycerol during freezing and thawing.
Journal of Cell. Comp. Physio., 6, 167, 1963
115. SHERMAN, J.K.:
Research on frozen human semen.
Fertility and Sterility, 15, 485, 1964
116. SHERMAN, J.K.:
Freeze-thaw-induced latent injury as a phenomenon in cryobiology.
Cryobiology, 3, 407, 1967
117. SHERMAN, J.K. and F. CHAR,
Stability of Y-chromosome fluorescence during freeze-thawing and frozen storage of human spermatozoa.
Fertility and Sterility, 4, 311, 1974

118. SHETTLES, L.B.:
The respiration of human spermatozoa and their
response to various gases and low temperature.
American Journal of Physiology, 128, 408, 1940
119. SHETTLES, L.B.:
Samenmorphologie, zervikales Milieu, Zeitpunkt
der Insemination und Geschlechtsverhältnisse.
Andrologie, 3, 227, 1973
120. SILLO-SEIDL, G.:
Gefrierbehandlung in der Medizin.
Medizinische Klinik, 356, 1973
121. SILLO-SEIDL, G.:
Homologe Insemination: Praktische Erfahrungen
mit Tiefkühl-Sperma.
Fortschr. Med., 28, 1974
122. SIMS, J.M.:
Clinical notes on Uterine surgery.
W. Wood, New York, 1866
123. SOKOL, K. und R. KADEN:
Entwicklung und Technik der Kryosperma-Konservierung.
Arch. Dermat. Forschung, 244, 441, 1972
124. SOKOL, K.:
Vorrichtung zum Einfrieren von Sperma.
Patentschrift und Patent, 1958
125. SOKOL, K.:
Humanspermakonservierung.
Schweiz. Z. Gynäk. Geburtsh. 1, 221, 1970
126. SOKOL, K., R. KADEN, K. SPERLING und K. GROSSGEBAUER:
Kryospermaforschung.
Fortschr. d. Med., 27, 89, 1971

127. SOUTHAM, A.L. and L. BUXTON:
Seventy postcoital tests made during the conception cycle.
Fertility and Sterility, 2, 133, 1956
128. SPALLANZANI, L.:
Opusculu di Fisca animale e Vegetabile Opusculo II
osservaioni, e Sperience intoreno Ai Vermicelli
Spermatici, dell'Uomo e degli Animati.
Moderna, 1776
129. SPEICHINGER, J.P. and J.H. MATTOX:
Homologous artificial insemination and oligospermia.
Fertility and Sterility, 2, 135, 1976
130. STEINBERG, W.:
Cervical aspects in sterility and infertility.
Fertility and Sterility, 2, 169, 1955
131. STEIMAN, R.P. and M.L. TAYMORE:
Artificial insemination homologous and its role
in the management of infertility.
Fertility and Sterility, 2, 146, 1977
132. STOLL, P.:
Die kinderlose Ehe: Störungen der weiblichen
Fruchtbarkeit.
Fortschr. Med., 27, 91, 1973
133. STROTZKA, H. und A. SPRINGER:
Umweltschäden und Fertilität des Mannes.
Andrologie, 3, 183, 1973
134. SULLIVAN, H. and W.L.G. QUINLIVAN:
Complement and antibody in selfagglutinating
human semen.
Fertility and Sterility, 7, 644, 1974

135. TAIT, B.D., J.U. BARRIE, J. JOHNSTON and P.J. MORRIS:
Cellular immunity to lymphocyte antigens in human infertility.
Fertility and Sterility, 4, 389, 1976
136. TAUBERT, H.D.:
Ärztlicher Rat für kinderlose Ehepaare.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1972
137. ULSTEIN, M.:
Evaluation of a capillary tube sperm penetration method for fertility investigations.
Acta Obstet Gynec Scand, 51, 287, 1972
138. ULSTEIN, M.:
Sperm penetration of cervical mucus as a criterion of male fertility.
Acta Obstet Gynec Scand, 51, 335, 1972
139. ULSTEIN, M.:
Fertility of husbands at homologous insemination.
Acta Obstet Gynec Scand, 52, 5, 1973
140. ULSTEIN, M.:
Fertility of donors at heterologous insemination.
Acta Obstet Gynec Scand, 52, 97, 1973
141. ULSTEIN, M.:
Fertility, motility and penetration in cervical mucus of freeze-preserved human spermatozoa.
Acta Obstet Gynec Scand, 52, 205, 1973
142. ULSTEIN, M.:
In vitro sperm penetration of cervical mucus and male fertility.
Andrologie, 5, 189, 1973
143. ULLSTEIN, M. and B. FJÄLLBRANDT:
Interrelation of different parameters at cervical mucus penetration of spermatozoa.
Acta Obstet. Gynec. Scand., 52, 295, 1973

144. VOORST, C. van and E. van DUIJN jr.:
An improved microscopical method for determining
the numbers of motile and non-motile spermatozoa.
Andrologia, 3, 211, 1974
145. WALL, J.R., J. STEDRONSKA and M.H. LESSOF:
Antibodies against sertoli cells in human infertility.
Clinical Endocrinology, 2, 3, 1974
146. WESTFALL, F. and G. HARRIS jr.:
A proteolytic digestion technique for evaluating
freeze-induced damage to acrosomes of chicken
spermatozoa.
Cryobiology, 3, 11, 1974
147. WILSON, L.:
Sperm agglutination due to autoantibodies.
Fertility and Sterility, 7, 262, 1956
148. WÖLKE, M.:
Konservierbarkeit von Humansperma in flüssigem
Stickstoff.
Med. Dissertation, Freie Universität Berlin, 1973
149. WOLF, D.P., L. BLASCO, M.A. KHAN and M. LITT:
Human cervical mucus, Part I, II and III
Fertility and Sterility, 1, 41, 1977

Ich danke Herrn Professor Dr. med. R. KADEN für die Überlassung des Themas und für die wertvolle Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bei Frl. von Arnoldi bedanke ich mich für die ausgezeichnete technische Assistenz.

Weiterhin danke ich der Abteilung für Medizinische Statistik und Dokumentation im Klinikum Steglitz für ihre Beratung.

Am 4. Juni 1948 wurde ich in Bad-Hersfeld geboren. Von 1954 bis 1962 besuchte ich in München die Volksschule. Nach einer 3-jährigen kaufmännischen Lehre bestand ich 1965 die Kaufmanns-Gehilfen-Prüfung. Das Berlin-Kolleg besuchte ich von 1967 bis 1970. Hier bestand ich am 16.1.1970 die Reifeprüfung.

Im SS 1970 wurde ich an der Freien Universität im Studienfach Psychologie immatrikuliert. Das Medizinstudium nahm ich im SS 1971 auf. Am 11.4.1973 bestand ich das Physikum und am 27.10.1976 das medizinische Staatsexamen.

Am 14. Juni 1974 heiratete ich, unsere Tochter wurde am 22. April 1975 geboren.

DISSERTATIONS-DRUCK MONATH
Wichurastr. 58c Tel. 030/7754777 1 Berlin 46